

PUBLICATION NUMBER : 07228542  
PUBLICATION DATE : 29-08-95

APPLICATION DATE : 18-02-94  
APPLICATION NUMBER : 06020884

APPLICANT : NIPPON SEIBUTSU KAGAKU KENKYUSHO;

INVENTOR : UEDA SUSUMU;

INT.CL. : A61K 39/12 A61K 39/00 A61K 39/102 C12N 7/04 //(C12N 7/04 , C12R 1:92 )

TITLE : AVIAN VACCINE ENDOTRACHEALLY USED OF INACTIVATED PATHOGEN

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain an inactivated vaccine for endotracheal administration an avian infectious disease in bursa of Fabricius, by endotracheally administrating an antigen to induce an effective immunity to the avian infectious disease.

CONSTITUTION: This prophylactic vaccine for endotracheal administration to be used for an avian infectious disease in bursa of Fabricius, contains a virus of the avian infectious disease in bursa of Fabricius inactivated by formalin as a major component.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-228542

(43) 公開日 平成7年(1995)8月29日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/12	A F E			
39/00	A F G J			
39/102	A F F			
C 1 2 N 7/04		9281-4B		
// (C 1 2 N 7/04				

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-20884

(22) 出願日 平成6年(1994)2月18日

(71) 出願人 000173865

財団法人日本生物科学研究所  
東京都青梅市新町2221番地1

(72) 発明者 中村 俊博

東京都青梅市新町63ベルゾーネ土田102

(72) 発明者 星 澄夫

東京都青梅市師岡町4-7-41 リナシメ  
ント河辺206号

(72) 発明者 上田 進

埼玉県所沢市中新井3-12-19

(74) 代理人 弁理士 本多 小平 (外3名)

(54) 【発明の名称】 不活化病原体の鶏用気管内投与ワクチン

(57) 【要約】

【目的】 気管内に抗原を投与することによって鶏の感染症に対する有効な免疫を誘導する鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの不活化気管内投与ワクチンを提供する。

【構成】 ホルマリンにより不活化した鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを主成分とする鶏伝染性ファブリキウス嚢病の予防用気管内投与ワクチン。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 不活化した鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを主成分とする鶏伝染性ファブリキウス嚢病予防用の鶏用気管内投与ワクチン。

【請求項2】 不活化したマイコプラズマガリセプチカムを主成分とするマイコプラズマ病予防用の鶏用気管内投与ワクチン。

【請求項3】 不活化したヘモフィルスパラガリナラムA型を主成分とする鶏伝染性コリーザA型予防用の鶏用気管内投与ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、不活化病原体を用いて、鶏の感染症の予防に有効な免疫誘導を与えることができる気管内投与ワクチンに関するものである。

【0002】

【発明の背景及び従来技術】従来から、種々の動物の感染症は生病原体及び不活化された病原体をワクチンとして用いて予防されており、その投与方法は生ワクチンでは種々の方法が採用されているが、不活化ワクチンでは通常、注射による方法が採用されていて、気管内投与による方法は用いられていない。

【0003】そして鶏の感染症に対する投与ワクチン、特にそのうちの具体的な鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（以下「IBDV」と称す）、マイコプラズマパラガリナラム (*Mycoplasma gallisepticum*)、ヘモフィルスパラガリナラム (*Haemophilus paragallinarum*) A型についてのワクチンは、気管内投与法は全く採用されていないだけでなく、提案としてもされていない。

【0004】しかし、不活化ワクチンを用いた注射による投与は、1個体ずつ行わなければならないため非常に手間がかかるという問題がある他、また針を刺すという行為から鶏にストレスを与えることになり、経済的な負担が大きという問題がある。また不活化ワクチンは水酸化アルミニウムゲル、燐酸アルミニウムゲルあるいはオイルアジュバント等を有効成分に加えなければ十分な効果が得られず、加えてその程度には差はあるが、これらの添加物が接種部位に炎症反応を引き起こしたり残留したりして、食肉利用の際に廃棄される可能性もある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は以上のような従来技術の状況において、気管内に投与することによって鶏の感染症に対する有効な免疫を誘導することができる不活化気管内投与ワクチンを提供することを目的としてなされたものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記目的を実現した本発明の請求項1に記載の気管内投与ワクチンの特徴は、感染鶏のファブリキウス嚢由来あるいは感染した培養細胞由来の鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBD

V）をホルマリン不活化したものを主成分とするところにあり、この不活化病原体を主成分とするワクチンは、気管内に投与することで用いられる。

【0007】このような不活化IBDVを主成分とする気管内投与ワクチンは、精製して用いる場合の他、注射による投与ワクチンと同様に臓器由来成分、培養細胞由来成分が混入していても用いることができ、他方注射による投与ワクチンと比べて、水酸化アルミニウムゲル、燐酸アルミニウムゲル、オイルアジュバントなどを添加する必要がない。

【0008】また、本発明の請求項2に記載の気管内投与ワクチンの特徴は、ホルマリン不活化したマイコプラズマガリセプチカムを主成分とするところにあり、この不活化病原体を主成分とするワクチンは、気管内に投与することで用いられる。

【0009】このような不活化マイコプラズマガリセプチカムを主成分とする気管内投与ワクチンは、精製して用いる場合の他、注射による投与と同様に培地成分が混入していても用いることができるが、注射による投与ワクチンと比べて、水酸化アルミニウムゲル、燐酸アルミニウムゲル、オイルアジュバントなどを添加する必要がない。

【0010】更に又本発明の請求項3に記載した気管内投与ワクチンの特徴は、チメロサル、ホルマリン、 $\beta$ -プロピオラクトン、マーズニンから選択される不活化剤を用いて不活化したヘモフィルスパラガリナラムA型を主成分とするところにあり、この不活化病原体を主成分とするワクチンは、気管内に投与することで用いられる。

【0011】このような不活化ヘモフィルスパラガリナラムA型を主成分とする気管内投与ワクチンは、精製して用いる場合の他、注射による投与ワクチンと同様に培地成分を洗浄する際に使用されるPBS成分が混入していても用いることができるが、注射による投与ワクチンと比べて、水酸化アルミニウムゲル、燐酸アルミニウムゲル、オイルアジュバントなどを添加する必要がない。

【0012】本発明の上記各ワクチンを気管内投与する方法は、カテーテルあるいはゾンデを用いて気管内に直接投与する、また噴霧により投与する、凍結乾燥したワクチンの散布により投与する、発泡剤と混合して投与する等の方法を用いることができる。

【0013】

【実施例】以下本発明の実施例に基づいて説明するが、本発明がこの実施例に限定されるものでないことは言うまでもない。

【0014】実施例1

不活化IBDV、91-6株気管内投与ワクチンの製造  
5週齢のSPFラインMニワトリに91-6株IBDV（下記参照）を経口的に接種し、3日後、感染ニワトリのファブリキウス嚢を取り出し、細切した後、等量の燐

酸緩衝食塩水 (pH 7.2: 以下「PBS」と略記する) を加えてホモジナイズし、遠心にて組織の破片等を除いた上清に0.2%になるようにホルマリンを加え、37℃で48時間不活化し、その後、使用まで4℃の冷蔵庫に保存した。

(91-6株; 高度病原性株)

[Z. Lin, A. Kato, Y. Otaki, T. Nakamura, E. Sasmaz, and S. Ueda. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. Avian Diseases. 37:315-323, 1993. T. Nakamura, A. Kato, Z. Lin, T. Nunoya, Y. Otaki, and S. Ueda. A rapid quantitative method for detecting infectious bursal disease virus using polystyrene latex microspheres. J. Virol. Methods, 43:123-130, 1993]

#### 実施例2

##### 不活化マイコプラズマガリセプチカム気管内投与ワクチンの製造

マイコプラズマガリセプチカム (Mycoplasma gallisepticum) SAS株 (下記参照) を液体培地にて37℃、48時間培養した菌液に、ホルマリンを0.1%になるように加えて不活化した後、チメロサルを0.01%になるように加え、4℃の冷蔵庫で保存した。

【0015】SAS株 (日生研MG不活化マワクチン (商品名; 日生研株式会社製) に使用されている株)

#### 実施例3

##### 不活化鶏伝染性コリーザ (IC, Haemophilus paragallinarum) A型気管内投与ワクチンの製造

ヘモフィルスパラガリナラム (Haemophilus paragallinarum) A型の221株 (下記参照) を培地にて37℃、20時間培養した後、8000rpmで30分遠心し、その沈澱を、菌数が $2.5 \times 10^{10}$ になるようにPBS (前出) に浮遊し、0.01%になるようにチメロサルを加えて不活化し、その後、使用まで4℃の冷蔵庫に保存した。

(221株)

[日生研コリーザワクチン (商品名; 日生研株式会社製) に使用されている株]

Otauki, K. and Y. Iritani. Preparation and immunological response to a new mixed vaccine composed of inactivated Newcastle disease virus, inactivated infectious bronchitis virus, and inactivated Haemophilus gallinarum. Avian Diseases. 18:297-304, 197

4]

以上のようにして製造した各気管内投与ワクチンについて、以下の試験1, 2を行った。

【0016】試験例1については不活化後ラテックス凝集価を下記の方法①に準拠して測定すると共に、IBDVに対する抗体価を下記方法②に準拠して測定した。

【0017】① IBDVのラテックス凝集反応による抗原量の測定法

[T. Nakamura, A. Kato, Z. Lin, T. Nunoya, Y. Otaki, and S. Ueda. A rapid quantitative method for detecting infectious bursal disease virus using polystyrene latex microspheres. J. Virol. Methods, 43:123-130, 1993]

② IBDVのラテックス凝集阻害反応による抗体価の測定法

[T. Nakamura, Y. Otaki, Z. Lin, and A. Kato. Rapid and quantitative assay system for measuring anti-infectious bursal disease virus antibody using monoclonal antibody bound polystyrene latex microsphere. Avian Diseases, 37:1993]

試験例2の凝集抗体の測定は、マイコプラズマ・ガリセプチカム急速凝集用菌液 (商品名; 日生研株式会社製) を用いその使用方法に準拠した。

【0018】試験例1

##### 不活化IBDV気管内投与ロワクチンの抗体誘導能及び感染防御試験

不活化後のラテックス凝集価が32の実施例1のウイルス液の原液をそれぞれ0.5ml、 $(1/4) \times 0.5$  ml、 $(1/16) \times 0.5$  mlおよび $(1/64) \times 0.5$  mlをPBSで必要な場合は希釈して0.5mlとして、SPFニワトリ (ラインM、4週齢)、1群5~10羽に2週間隔で2回投与した。

【0019】また、陽性対照として市販の不活化ワクチンを2回筋肉内に注射した。

【0020】初回免疫4週後に採血し、血清の抗体価をラテックス凝集阻害反応で測定した。また採血直後にIBDV、90-11株 ( $10^{4.5}$  EID<sub>50</sub>) を気管内投与投与攻撃して生死及びファブリキウス囊の病変を組織学的に調べた。

【0021】結果を表1に示す。

【0022】

【表1】

表 1

投与経路	数	株	抗原量	投与量	溶液	GMLIT	防御率
気管内	8	91	1 倍	0.5	PBS	59	100%
気管内	5	91	1/4倍	0.5	PBS	64	100%
気管内	5	91	1/16倍	0.5	PBS	64	100%
気管内	5	91	1/64倍	0.5	PBS	37	100%
筋肉内	5	IQ	1 dose	1.0	Al Gel	32	100%
対照	10					<1	0%

抗原量：91株の場合、LAT=32の抗原液 1ml中の抗原量を原液（1 倍）とする

IQ株の場合、ワクチンの 1 doseを 1 doseとする

溶液：Al Gel、水酸化アルミニウムゲル（市販ワクチン）

GMLIT：LATの幾何平均値

防御率：攻撃後に生残し、かつファブリキウス腫瘍病変が認められなかった鶏の割合

【0023】表1によれば、本発明の実施例1の不活化ワクチンを2回投与された全ての鶏で、市販ワクチンと同等以上の抗体産生が認められ、かつ全例が感染防御することが分かった。

【0024】（90-11；高度病原性株）

[T.Nunoya, Y.Otaki, M.Tajima, M.Hiraga, and T.Saito. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens. Avian Diseases, 36:597-609, 1992. T.Nakamura, Y.Otaki, and T.Nunoya. Immunosuppressive effect of a highly virulent infectious bursal disease virus isolated in Japan. Avian Diseases. 36:891-896, 1992]

#### 試験例2

不活化マイコプラズマ気管内投与ワクチンの抗体誘導能及び感染防御試験

菌数が $2 \times 10^{11}$ の菌液の原液それぞれ0.5ml, 0.05ml, 0.005ml（順に $10^{11}$ 、 $10^{10}$ 、及び $10^9$ の菌が含まれている）をPBSで希釈し0.5mlとして、SPFニワトリ（ラインS、4週齢）に2週間隔で2回気管内投与した。

【0025】また陽性対照として不活化ワクチンを1回筋肉内に注射した。

【0026】初回免疫4週後に採血し、血清の抗体価を平板凝集阻害反応で測定した。採血直後に、Mycoplasma gallisepticum SAS株（菌数 $4 \times 10^6$ ）を気管内接種攻撃し、2週間後に気管の組織病変をスコアリングした。

【0027】結果を表2に示す。

【0028】

【表2】

表 2

投与経路	投与量	番号	凝集反応	気管病変	防御率
対照	0	408	—	2	67%
		409	—	1	
		410	—	1	
		411	—	2	
		412	—	2	
		413	—	2	
気管内 (2回)	10 <sup>11</sup>	414	+++	1	0%
		415	+++	0	
		416	+++	1	
		417	+++	1	
		418	+++	0	
		419	+++	1	
		456	+++	1	
		457	+++	1	
		458	+++	1	
筋肉内 (1回)	10 <sup>9</sup>	450	+++	1	0%
		451	+++	0	
		453	++	0	
		454	++	1	
		455	+++	1	

凝集反応、陰性 (—) : 120秒まで凝集しない

偽陽性 (±) : 61-120秒で凝集

陽性 (+) : 31-60秒で凝集

(++) : 11-30秒で凝集

(+++): 0-10秒で凝集

気管病変、0から3までスコアリング

0 : 粘膜が正常

1 : リンパ球の軽微な浸潤

2 : 粘膜の高度な肥厚、上皮の変性

3 : 2がさらに高度なもの

防御率、気管病変が2以上の個体の割合

【0029】表2によれば本発明の実施例2の不活化ワクチンを2回投与された全ての鶏で市販ワクチンと同等以上の抗体産生が認められ、かつ全例が感染防御することがわかった。

#### 【0030】試験例3

##### 不活化IC気管内投与ロワクチンの抗体誘導能及び感染防御試験

菌数が $2.5 \times 10^{10}$  mlの実施例3の菌液の原液のそれぞれ0.4 ml、0.04 ml及び0.004 ml

(順に $10^{10}$ 、 $10^9$ 、及び $10^8$ の菌が含まれている)をPBSで希釈し0.5 mlとして、SPFニワトリ(ラインM、6週齢)に2週間隔で2回気管内投与した。

【0031】また、陽性対照として不活化ワクチンを1回筋肉内に注射した。

【0032】初回免疫4週後に採血し、血清の抗体価を赤血球凝集阻害反応で測定した。採血直後にHaemophilus paragallinarum A型221株(菌数 $3 \times 10^6$ )を点鼻接種攻撃し、1週間観察した。発症は鼻汁あるいは顔面の腫脹にて判定した。菌分離は鼻汁を出したニワトリについては鼻汁より行い、鼻汁を出さなかったニワトリ及び鼻汁から菌分離されなかったニワトリについては攻撃1週後に眼窩下洞よりスワブを採取して行った。結果を表3～表5に示す。

#### 【0033】

##### 【表3】

表 3

投与経路 (量)	個体番号	H I 抗体価	発症	菌分離
気管内 ( $1 \times 10^8$ )	901	<2	-	-
	902	<2	+	+
	903	<2	+	+
	904	4	-	-
	905	<2	-	-
	906	2	-	-
	907	2	-	-
	908	2	-	-
	909	<2	-	-
	910	2	-	-
	911	<2	-	-
	912	<2	+	+
気管内 ( $4 \times 10^8$ )	913	<2	-	-
	914	2	-	-
	915	<2	-	-
	916	<2	-	-
	917	2	-	-
	918	<2	-	-
	919	4	-	-
	920	<2	+	+
	921	<2	+	+
	922	<2	-	-
	923	<2	-	-
	924	<2	-	-
気管内 ( $16 \times 10^8$ )	925	<2	-	-
	926	<2	-	-
	927	4	-	-
	928	<2	-	-
	929	8	-	-
	930	<2	-	-
	931	8	-	-
	932	4	-	-
	933	2	-	-
	934	8	-	-
	935	2	-	-
	936	2	-	-

I C 発症：鼻汁、涙、顔面腫脹を攻撃後、1 週間観察

菌分離：鼻汁が観察された鶏については鼻汁スワブより採材、鼻汁が観察されなかった鶏については攻撃 1 周後の殺処分時に眼窩下洞スワブより採材

【0034】

表 4

投与経路 (量)	個体番号	H I 抗体価	発症	菌分離
筋肉内 ( $1 \times 10^8$ ) (ワクチン)	937	32	-	-
	938	16	-	-
	939	32	-	-
	940	64	-	-
	941	32	-	-
	942	64	-	-
	943	16	-	-
	944	128	-	-
	945	64	-	-
	946	16	-	-
気管内 ( $16 \times 10^8$ )	947	<2	+	+
	948	<2	+	+
	949	<2	+	+
	950	<2	+	+
	951	<2	+	-
	952	<2	+	+
	953	<2	+	+
	954	<2	+	+
	955	<2	+	-
	957	<2	+	-
	958	<2	+	-

I C 発症：鼻汁、涙、顔面腫脹を攻撃後、1 週間観察

菌分離：鼻汁が観察された鶏については鼻汁スワブより採材、鼻汁が観察されなかった鶏については攻撃 1 周後の殺処分時に眼窩下洞スワブより採材

【0035】

【表5】

表 5

投与経路 (量)	HI抗体価	発症	菌分離	防御率
気管内 ( $1 \times 10^8$ )	5/12	3/12	3/12	75%
気管内 ( $4 \times 10^8$ )	3/12	2/12	2/12	83%
気管内 ( $16 \times 10^8$ )	8/12	0/12	0/12	100%
筋肉内 ( $1 \times 10^8$ )	10/10	0/10	0/10	100%
対照	0/11	11/11	7/11	0%

【0036】表3～表4によれば実施例3のワクチンを1羽1回当たり $16 \times 10^8$  菌気管内投与されたニワトリでは12羽中8羽で抗体の上昇が認められ、12羽全てが感染防御することが明かとなった。また、 $1 \times 10^8$  及び $4 \times 10^8$  菌気管内投与されたニワトリでも抗体価が上昇するものが現れ順に12羽中9羽、12羽中10羽が感染防御することが明かとなった。

【0037】

【発明の効果】以上のように本発明の不活化気管内投与

ワクチンを用いて、従来の不活化ワクチンの注射による免疫と同等の免疫誘導を得ることができる効果がある。

【0038】したがって、従来、いずれも注射によって筋肉内に投与されていた鶏伝染性ファブリキウス嚢病、マイコプラズマ感染症及び鶏伝染性コリーザの不活化ワクチンは、本発明の不活化気管内ワクチンを気管内投与することによってそれぞれの病原体に対する抗体を誘導して、感染症を有効に予防することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>  
C 1 2 R 1:92)

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所